

English abstract of
JP 2003- 334858

Use of collagen of aquatic origin for the production of supports for tissue engineering, and supports and biomaterials obtained

Patent number: US6541023
Publication date: 2003-04-01
Inventor: ANDRE VALERIE (FR); ABDUL MALAK NABIL (FR); HUC ALAIN (FR)
Applicant: COLETICA (FR)
Classification:
- international: **A61L27/38; A61L27/48; A61L27/56; A61L27/60; C12N5/00; A61L27/00; C12N5/00;** (IPC1-7): A61F2/10; A61K38/39; C07K14/78
- european: **A61L27/38; A61L27/48; A61L27/56; A61L27/60; C12N5/00S**
Application number: US20000616282 20000714
Priority number(s): FR20000006748 20000526

Also published as:

FR2809412 (A)

Report a data error here

Abstract of US6541023

Use of collagen of aquatic origin for the production of supports for tissue engineering is disclosed. The collagen may be obtained from fish skin, preferably in its native form. Novel tissue engineering supports with a low risk of contamination are produced.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2003-534858
(P2003-534858A)

(43)公表日 平成15年11月25日 (2003.11.25)

(51)Int.Cl.⁷
A 6 1 L 27/00
A 6 1 P 17/00
// A 6 1 K 35/60
38/17

識別記号

F I
A 6 1 L 27/00
A 6 1 P 17/00
A 6 1 K 35/60
C 1 2 N 11/02

テ-マコ-ト(参考)
C 4 B 0 3 3
V 4 C 0 8 1
4 C 0 8 4
4 C 0 8 7

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002-500933(P2002-500933)
(86) (22)出願日 平成13年5月25日 (2001.5.25)
(85)翻訳文提出日 平成14年11月26日 (2002.11.26)
(86)国際出願番号 PCT/FR01/01629
(87)国際公開番号 WO01/092322
(87)国際公開日 平成13年12月6日 (2001.12.6)
(31)優先権主張番号 00/06748
(32)優先日 平成12年5月26日 (2000.5.26)
(33)優先権主張国 フランス (FR)
(31)優先権主張番号 09/616, 282
(32)優先日 平成12年7月14日 (2000.7.14)
(33)優先権主張国 米国 (US)
(81)指定国 DE, JP, KR, US

(71)出願人 コレティカ
COLETICA
フランス国 69007 リヨン 32 リュ
サン-ジャン-ドードュウ
32 rue Saint Jean-de
Dieu 69007 LYON, FRA
NCE
(72)発明者 ヴァレリー アンドレ
フランス国 エフ-69420 アンビュイ,
リュ ドゥ モンリー ヴルネー 15
(74)代理人 弁理士 安富 康男

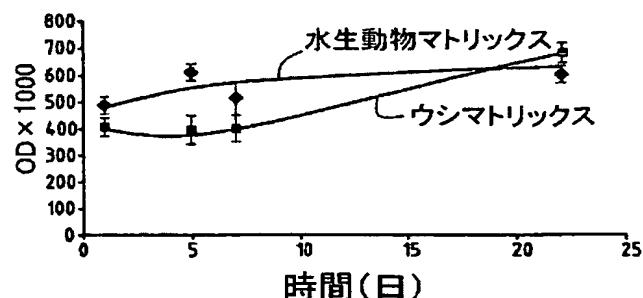
最終頁に続く

(54)【発明の名称】組織工学用にデザインされた担体を製造するための水生動物起源のコラーゲンの使用並びにそれにより得られる担体及び生体材料

(57)【要約】

本発明は組織工学用にデザインされた担体を製造するための水生動物期起源のコラーゲンの使用に関する。コラーゲンは魚類の皮膚から得られるのが有利であり、天然体であるのが好ましい。本発明は汚染の危険性が少ない新規組織工学用担体の製造を可能にする。

真皮等価物における増殖



【特許請求の範囲】

【請求項1】 組織工学用担体を製造するための水生動物起源のコラーゲン（好ましくは、硬骨魚類の皮膚に由来するコラーゲン）の使用。

【請求項2】 コラーゲンが硬骨魚類の皮膚に由来し、より具体的には無着色の皮膚領域を有する魚類に由来し、さらにより具体的にはカレイ目の魚類に由来し、特に、例えば、シタビラメ（s o l e）、マコガレイ（d a b）、ターボット（t u r b o t）、ブリル（b r i l l）などのような産業的に漁獲されている魚類（好ましくはシタビラメ）に由来することを特徴とする請求項1に記載の使用。

【請求項3】 コラーゲンは、その機械的強度又は酵素消化に対するその抵抗性が、化学的架橋及び／又は物理的架橋、又は、コラーゲンと強く相互作用する天然高分子の付加、又は、これらの2つの処理の任意の組合せのいずれかによって増大していることを特徴とする請求項1又は2に記載の使用。

【請求項4】 コラーゲンが、凍結乾燥工程を受けたコラーゲンゲルから調製される多孔性マトリックスの形態で使用されることを特徴とする請求項1、2又は3に記載の使用。

【請求項5】 多孔性マトリックスが、物理的方法によって、好ましくは熱水脱水又はT D H（加熱脱水）によって架橋されることを特徴とする請求項4に記載の使用。

【請求項6】 多孔性マトリックスが、化学的方法によって、好ましくはジフェニルホスホリルアジド若しくはD P P Aを用いた処理によって、又は、カルボジイミドを用いた処理によって、又は、N-ヒドロキシスクシンイミドを用いた処理によって、又は、グルタルアルデヒドを用いた処理によって架橋されることを特徴とする請求項4又は5に記載の使用。

【請求項7】 コラーゲンが、水生動物コラーゲンから（好ましくは天然体で）調製され、キトサン及び必要に応じて少なくとも1つのグリコサミノグリカン（好ましくはコンドロイチン硫酸）と混合された多孔性マトリックスを含むことを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6に記載の使用。

【請求項8】 コラーゲンが、コラーゲンゲルから調製された多孔性マトリック

スを含み、前記多孔性マトリックスは、少なくとも1つの面が、（好ましくは空気中又はガス流体中で）コラーゲンゲルを乾燥することによって調製されたコラーゲンフィルム、及び圧縮されたコラーゲン海綿状体から選択される本質的には目の詰まったコラーゲン膜で覆われる、請求項1、2、3、4、5、6又は7に記載の使用。

【請求項9】 多孔性の層及び本質的には目の詰まった膜の少なくとも1つが、特に若年の個体又は中高年の個体に由来する、正常な生きた細胞、遺伝子操作された生きた細胞、及び、悪性の生きた細胞からなる群から選択される生きた細胞を含むことを特徴とする請求項6、7又は8に記載の使用。

【請求項10】 生きた細胞が、纖維芽細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、血液に由来するランゲルハンス細胞、血液に由来する内皮細胞、血液細胞（特に、マクロファージ又はリンパ球）、脂肪細胞、皮脂細胞（sebocyte）、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、及び、血液に由来するメルケル細胞からなる群から選択され、正常又は遺伝子操作型又は悪性であることを特徴とする請求項9に記載の使用。

【請求項11】 多孔性の層が、正常又は遺伝子操作型又は悪性の纖維芽細胞から選択される生きた纖維芽細胞を含有する層であり、本質的には目の詰まった膜が、ケラチノサイト、メラノサイト、血液に由来するメルケル細胞、血液に由来するランゲルハンス細胞、皮脂細胞（sebocyte）、血液に由来する細胞、及び、神経細胞から選択される正常又は遺伝子操作型又は悪性の生きた細胞を含有する膜であることを特徴とする請求項9又は10に記載の使用。

【請求項12】 圧縮されるコラーゲン海綿状体の圧縮が、少なくとも約50bar（ 50×10^5 Pa）の圧力で、好ましくは50bar（ 50×10^5 Pa）～200bar（ 200×10^5 Pa）の範囲の圧力で行われ、そして必要に応じて20°C～80°Cの温度で、さらにより良好には40°C～60°Cの温度で行われることを特徴とする請求項8、9、10又は11に記載の使用。

【請求項13】 本質的には目の詰まった膜が、コラーゲン海綿状体を含むことが好ましい多孔性の層との組合せに先立って、具体的には、膜を調製して、それをコラーゲンゲルの上に置き、その後、コラーゲン海綿状体とコラーゲンゲルと

を組み合わせたものを凍結及び凍結乾燥することによって調製される膜であることを特徴とする請求項8、9、10、11又は12に記載の使用。

【請求項14】 請求項1から13のいずれか一項に記載のコラーゲンを含む組織工学用担体。

【請求項15】 生体材料（例えば再生用結合組織又は再生皮膚の形をとるもの）であって、請求項1から14のいずれか一項に記載のコラーゲンから調製され、好適には実質的に若年の個体のみに由来する細胞又は実質的に中高年の個体のみに由来する細胞のいずれかを含み、特に、組織の老化プロセス及び特に皮膚の老化プロセスを研究し、そして最終的にはこのプロセスにおける活性な成分の効力を試験するための生体材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、本質的には、組織工学用担体を製造するための水生動物起源のコラーゲンの使用、並びに、それにより得られる担体及び生体材料に関する。

【0002】

コラーゲンは、細胞の成長に特に好ましい基質である。これは、このタンパク質が、生きた細胞を含有する再生組織を生産するために、いくつかの形態（すなわち、マトリックス、ゲル又はフィルム）で非常に広く使用されているからである。

【0003】

すばらしい未来があることを期待させる技術である組織工学の分野では、コラーゲンは、特に人工皮膚又は人工軟骨の生産をもたらしている。満足できる結果を達成するためには、コラーゲンは、物理的若しくは化学的な架橋プロセスによって、又は、このタンパク質と強く相互作用する天然高分子を存在させることによって、又は、最終的に両方のシステムの組合せによって、細胞の代謝による酵素分解から保護されなければならない。

【0004】

従来、このような組織工学への適用の場合、細胞を受容するために担体で使用されているコラーゲンは、哺乳動物から、最も頻繁にはウシの皮膚から抽出されていた。抽出後に得られるタンパク質の良好な機械的性質、酵素分解に対するその抵抗性、そして最後に、ヒトコラーゲンのアミノ酸組成と非常に類似しているそのアミノ酸組成によってこの供給源は選択されていた。これらのすべての理由から、このコラーゲンがヒト細胞の培養に適した唯一のものであると考えることは妥当であった。

【0005】

Faceb Journal（第14巻第4号、2000年3月15日）におけるYehらの論文（「組織工学用の新規な天然マトリックス：細胞-マトリックス相互作用の分析」）により、生体適合性を研究するために、ヒト皮膚のケラチノサイト及び繊維芽細胞とのその相互作用の研究にジンベイザメの無細胞コラーゲン

ゲンのマトリックスの使用が誘起された。

【0006】

DerwentアブストラクトXP002161598は、培養材料として魚類由来のコラーゲンを使用する方法を記載する特願平07-075566（マリノフォーラム、1995年3月20日公開）を参照している。

しかし、この培養は魚類細胞を取り扱っている。

【0007】

欧州特許EP-0753313 A1には、海洋生物を使用して、軟体動物又はイカから抽出したキチンの層又はシートを含む積層体の皮膚代用物が記載されている。この場合、キチン溶液が冷凍乾燥（凍結乾燥）されたとき、不溶性の非生分解性海綿状体を構成するキチン構造体が得られることから、キチンの使用は不可欠である。これは、キチンが、ヒト皮膚に存在する酵素によって分解されないからである。魚類皮膚のコラーゲンゲルはキチンの層又はシートの上に注ぐことができ、そして両者は約1週間にわたって冷蔵庫において乾燥される。実際、このコラーゲン層は緻密であり、多孔性ではない。このコラーゲン層には、生きた細胞を植え付けることができない。ここに記載した積層体は不活性な積層体であり、従って、下記の本発明とは対照的に、生きた細胞を植え付けることができず、そしてこれらの細胞の生存性を保つことができないと予想される。

【0008】

今回、本発明者らは、予想もしなかったことに、ヒト細胞が、魚類コラーゲン（好ましくは、架橋された魚類コラーゲン）からなるいくつかの担体の表面又はその内部で非常によく成長することに注目した。この海産コラーゲンは、好ましくは硬骨魚類の皮膚に由来し、より具体的には無着色の皮膚領域を有する魚類に由来し、より詳細にはカレイ目の魚類に由来し、特に、例えば、シタビラメ（s o l e）、マコガレイ（d a b）、ターボット（t u r b o t）、ブリル（b r i l l）などのような産業的に漁獲されている魚類に由来する。それらの切り身（f i l e t：フィレ）調製物は切り分けたものを含意する。より好ましいカレイ目の魚類は、無着色の腹側部分を容易に薄く切ることができるシタビラメである。

【0009】

さらに、本発明者らは、このような生体材料で培養されたヒト細胞が正常な代謝を保持していることを明らかにすることことができた。硬骨魚類の皮膚から抽出されたコラーゲンを用いて生きた細胞の保存及び増殖能を可能にする生体適合性と共に、さらにコラーゲンが架橋され、特筆すべきことに化学的に架橋されていることも、当業者には特に自明ではなかった。これは、一般に、コラーゲンを架橋することにより、架橋されたコラーゲンは、生きた細胞に対して、特にヒトの生きた細胞に対して、生体適合性を有しなくなり、毒性を有するからである。

【0010】

これらの生体材料は、フィルム、又は圧縮された海綿状体、又は多孔性マトリックスのいずれにもすることができる。これらは、下記に示される実施例においてその調製方法と一緒に記載される。

【0011】

本発明の1つの目的は、新規な生体材料を形成させるために好適な組織工学用の新規な担体、すなわち、上記担体で培養される正常な生きた細胞又は遺伝子操作されている生きた細胞又は悪性の生きた細胞の良好な増殖、及び、インビトロ又はインビボでのその後の増殖のために上記生きた細胞を含有するこれらの新規な生体材料の枠内で使用されるべき上記細胞類の良好な増殖を可能にするために好適な、組織工学用の新規な担体を提供することにある、新しい技術的問題を解決することである。

【0012】

本発明のさらなる目的は、製造コストが低く、そしてまた汚染の危険性が低い組織工学用の新規な担体を提供すること、従って、新規な生体材料を提供するために特に好適なそのような担体を生産することにある、新しい技術的問題を解決することである。

【0013】

本発明のさらなる主要な目的は、正常な生きた細胞又は遺伝子操作されている生きた細胞又は悪性の生きた細胞のインビトロ又はインビボでの増殖を可能にするために特に好適な組織工学用の新規な担体を提供することにある新しい技術的問

題を解決することである。この場合、その構造は、哺乳動物、特に動物又は好ましくはヒトにおけるインビボでの使用に関して十分な適合性を有しているが、一方で同時に、動物又は好ましくはヒトなどの上記哺乳動物の組織の構造と異なり、その結果、上記動物（好ましくはヒト）の新しく合成された組織と古い組織との間のその後の識別が可能になっている。

【0014】

本発明は、低コストで、汚染の危険性が低く又は汚染を伴うことなく、同時に、新しく合成された組織を同定することを容易に可能にするという、これらの技術的問題のすべてを満足できる様式で初めて解決する。このことは、当業者には特に自明ではなく、かつ予想できることでもない。

【0015】

従って、第1の特徴によれば、本発明は、組織工学用担体を製造するための水生動物起源のコラーゲンの使用に関する。

【0016】

「水生動物起源のコラーゲン」という表現は、水生動物起源の生物のコラーゲン含有組織に由来するコラーゲンを意味するとして理解される。このような生物は当業者には十分公知であり、これらには、限定されるわけではないが、例えば、水生哺乳動物（特に海洋哺乳動物）、クラゲ及び海水又は淡水の魚類が含まれる。当業者にとってはさらに、これらの生物の皮膚が本質的にコラーゲンを含有することは公知である。好ましくは、「水生動物起源のコラーゲン」は、硬骨魚科の魚類から、より具体的には、無着色の領域を有する魚類から、より具体的にはカレイ目の魚類から、特に上記に示した魚類から抽出される。最も好ましいカレイ目の魚類はシタビラメである。

【0017】

1つの好適な実施形態において、コラーゲンは、魚類の皮膚から、好ましくはその天然体で得られる。

【0018】

本発明の別の好適な実施形態において、コラーゲンの機械的強度又は酵素分解に対するコラーゲンの抵抗性が、化学的及び／又は物理的な架橋、又は、コラーゲ

ンと強く相互作用する天然高分子の付加、又は、両方のプロセスの組合せのいずれかによって増大する。

【0019】

本発明のさらに別の好適な実施形態において、コラーゲンは、凍結乾燥工程を好ましくは受けたコラーゲンゲルから調製される多孔性マトリックスの形で使用される。

【0020】

さらに別の好適な変形形態において、上記の多孔性マトリックスは、物理的方法によって、好ましくは熱脱水又はT D Hによって架橋される。

【0021】

さらに別の好適な変形形態において、上記の多孔性マトリックスは、化学的方法によって、好ましくは、ジフェニルホスホリルアジド若しくはD P P Aを用いた化学的方法によって、又は、カルボジイミド及び／又はN-ヒドロキシスクシンイミドを用いた化学的方法によって、又は、グルタルアルデヒドを用いた化学的方法によって架橋される。

【0022】

ある好適な実施形態において、上記のコラーゲンは、キトサン及び必要に応じて少なくとも1つのグリコサミノグリカン（好ましくはコンドロイチン硫酸）と混合された海産コラーゲン（好ましくは天然型）から調製された多孔性マトリックスの形態を取ることできる。

【0023】

本発明のさらに別の好適な実施形態において、上記のコラーゲンは、コラーゲンゲルから調製された多孔性マトリックスの形態を取ることでき、上記多孔性マトリックスは、少なくとも1つの面が（好ましくは空気中又はガス流体中で）コラーゲンゲルを乾燥することによって調製されたコラーゲンフィルム、又は、非常に大きく圧縮されたコラーゲン海綿状体のいずれかからなる本質的に目の詰まったコラーゲン膜で覆われる。

【0024】

別の好適な変形形態において、非常に大きく圧縮されたコラーゲン海綿状体の上

記の圧縮が、少なくとも約50bar（約 50×10^5 パスカル（Pa））の圧力で、好ましくは50bar（ 50×10^5 Pa）～200bar（ 200×10^5 Pa）の間の圧力で行われる。この場合、この圧縮は、必要に応じて20°C～80°Cの温度で、好ましくは40°C～60°Cの温度で行われる。

【0025】

本発明のさらに別の好適な特徴によれば、2つの層（すなわち、多孔性の層及び本質的に目の詰まった膜）の少なくとも1つは、特に若年の個体又は中高年の個体に由来する、正常な生きた細胞又は遺伝子操作されている生きた細胞又は悪性の生きた細胞を含む。

【0026】

1つの好適な実施形態において、生きた細胞は、繊維芽細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、血液に由来するランゲルハンス細胞、血液に由来する内皮細胞、血液細胞（特に、マクロファージ又はリンパ球）、脂肪細胞、皮脂細胞（sebocyte）、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、及び、血液に由来するメルケル細胞からなる群から選択される。この場合、上記細胞は正常であるか、又は、遺伝子操作されているか、又は、悪性である。

【0027】

1つの特に好適な実施形態において、多孔性の層は、正常又は遺伝子操作型又は悪性の繊維芽細胞を含有し、且つ、本質的には目の詰まった膜は、ケラチノサイト、メラノサイト、血液に由来するメルケル細胞、血液に由来するランゲルハンス細胞、皮脂細胞、血液に由来する細胞、及び、神経細胞から特に選択される正常又は遺伝子操作型又は悪性の生きた細胞を含有する。

【0028】

本発明のさらに別の好適な実施形態により、本発明は、若年の個体から採取された細胞を使用する「若い」再生皮膚、又は中高年の個体から採取された細胞から得られる「老化している」再生皮膚のいずれかを調製するために特に有益であると考えられる。これらのモデルにより、皮膚の老化プロセスの我々の知識を改善させ、かつ、このプロセスに対する活性な薬剤の影響を研究することが可能になる。

【0029】

別の特に好適な実施形態において、上記の本質的に目の詰まった膜は、コラーゲン海綿状体を含むことが好ましい多孔性の層との組合せに先立って、具体的には、膜を調製して、それをコラーゲンゲルの上に置き、その後、全体を凍結及び凍結乾燥することによって調製される。

【0030】

第2の特徴によれば、本発明はまた、上記に規定されるような水生動物起源のコラーゲン又はその全体を通して理解され、且つ、その一般性において本発明の不可欠な部分を形成する実施例を含む下記の説明から得られるような水生動物起源のコラーゲンを含む組織工学用の担体を包含する。従って、この特徴は、いずれかの技術と比較することにより新規性があると考えられるあらゆる特徴に関して、実施例の内容にかかわらず、その機能及びその一般性が理解される。

【0031】

第3の特徴によれば、本発明はまた、生体材料、例えば再生結合組織又は再生皮膚の形をとる生体材料を包含する。このような生体材料は、上記の第2の特徴の担体に関して、特徴のすべてが上記に規定され、さらにまた下記の説明から得られるような水生動物起源のコラーゲンから調製されている。

【0032】

本説明及び請求項の枠内において、「組織工学用の担体」という表現は、正常な生きた細胞又は遺伝子操作されている生きた細胞又は悪性の生きた細胞の培養及び増殖を、それがインビトロであってもインビボであっても行なうために使用される担体を意味する。この増殖は、動物及び好ましくはヒトを含む哺乳動物にインビボで適用されることが好ましい。本発明は、（例えば、再生結合組織又は再生皮膚の形をとる）生体材料を製造するための組織工学の枠内において、特に好ましい用途を有することが理解される。この枠内において、最初の工程は、一般には、上記生きた細胞を有する担体をインビトロで培養して、（例えば、再生結合組織又は再生皮膚の形をとる）生体材料を得ることであり、そして、次に二番目の工程は、損傷したか、若しくは、手術によって除去された結合組織を再生するため、又は、同様に皮膚を再生して、医学的理由が何であれ、損傷したか、

又は手術によって除去された領域を再置換するために、哺乳動物において、例えば、動物又は好ましくはヒトにおいて、この生体材料を、再生結合組織又は再生皮膚としてインビボで使用することであろう。

【0033】

好適なことに、このような組織工学用担体、又は、好ましくは（例えば再生結合組織又は再生皮膚の形をとる）生体材料は、具体的には、組織の老化プロセス及び特に皮膚の老化プロセスを研究するために、並びに、必要な場合には、このプロセスにおける活性な成分又は主成分の効力を試験するために、実質的に若年の個体のみから得られる細胞又は実質的に中高年の個体のみから得られる細胞のいずれかを含む。

【0034】

従って、本発明は、特に簡便な方法で、低コストで、汚染の危険性が低く、そして水生動物コラーゲンと、インビボでの使用の過程で新しく合成された哺乳動物コラーゲン又は好ましくはヒトコラーゲンとを識別できる、上記の新しい技術的課題に対する一般的な解決策を提供していることが理解される。

【0035】

実際、生きている人工組織を製造する際の魚類コラーゲンの使用は、哺乳動物源と比較して、3つの本質的な利点を有している。

- ・原材料として一般に使用される魚類皮膚は、非常に清浄な条件のもとで豊富に得ることができる。
- ・感染性汚染の危険が非常に低い。特に、プリオンタイプの伝染性病原体の危険性が全く知られてない。
- ・最後に、魚類コラーゲンのアミノ酸組成はヒトコラーゲンのアミノ酸組成とは比較的似ていないので、この2つのタンパク質は、特異的な抗体によって比較的容易に識別することができる。この方法論は、特に「インビトロ」試験又は「インビボ」治癒研究において非常に有益であろう。

【0036】

さらに、海産コラーゲンを使用すれば、免疫標識が非常に効果的に行なえ、そして海産コラーゲンと新しく合成されたコラーゲンとの識別が可能になるであろう

。

【0037】

魚類コラーゲンは、プロテアーゼによる酵素分解からそれ自体を保護し、かつその機械的性質に主に関わる天然構造を有している。従って、抽出操作及び精製工程のときに使用される処理によってタンパク質構造ができる限り分解されないことは非常に重要であろう。これは、らせん構造並びに分子間及び分子内の架橋ができる限り保持されなければならないことを意味している。本発明者らは、より詳細には、1994年7月19日に付与された米国特許第5331092号に記載される方法を実施することによってこれを達成した。それにもかかわらず、特定の適用のためには、部分的に架橋が開裂したコラーゲン、例えば、アテロコラーゲン（すなわち、そのテロペプチドの部分を失っているコラーゲン）の使用を想定することは可能であろう。

【0038】

その場合、組織工学の適用例の大部分にとっては、コラーゲンの機械的性質が高められ、そして酵素消化に対する抵抗性が、化学的及び／又は物理的な架橋技術によって、又は、このタンパク質と強く相互作用する天然高分子の付加によって、又は、最終的には両方のプロセスの組合せによって、そのいずれでも大きくなるであろう。

【0039】

魚類コラーゲンの保護は、その天然の安定性が哺乳動物コラーゲンの安定性よりも低いためにますます重要である。魚類コラーゲンの天然の安定性が低いという特徴は、ヒドロキシプロリン含有量がより低いことによるものである。

【0040】

上記に記載の生体材料には、「インピトロ」試験の分野又は損傷組織を修復するための薬学的分野のいずれでも使用され得る生きた人工組織を作製するために、生きた細胞を植え付けることができる。

【0041】

本発明の他の目的、特徴及び利点は、組織工学用担体の製造のための本発明の枠内並びに担体及び生体材料を構成する本発明の枠内で使用することができる水生

動物起源のコラーゲンの様々な形態を調製する実施例を参照にしてなされた、下記の説明のための記載から明瞭に明らかになるであろう。この場合、実施例は、例示として単に示されているだけであり、従って本発明の範囲を決して限定するものではない。

【0042】

実施例では、別途示されない限り、温度は°Cの単位で示され、圧力は大気圧であり、百分率は重量%で示される。

【0043】

実施例1～13は、当然のことではあるが、本発明による組織工学用担体として使用され得るコラーゲンを調製する実施例である。

【0044】

実施例14～16は、注目すべきことには、組織工学用担体の製造する観点から実施例1～13のうちのいくつで調製された形態の本発明の水生動物起源のコラーゲンを使用するという観点からの比較試験である。

【0045】

実施例1

水生動物の天然コラーゲンからなる多孔性マトリックスの調製

【0046】

このコラーゲンは、1994年7月19日に付与された米国特許第5331092号の技術によって得られる。

【0047】

A. 水生動物の天然コラーゲンの調製

コラーゲンゲルをシタビラメの腹側皮膚から調製する。皮膚を磨碎して、次いで下記の組成：0.78g／1のリン酸二水素カリウム及び21.7g／1のリン酸一水素二ナトリウムを有するリン酸緩衝液(pH7.8)で洗浄する。洗浄は、磨碎した材料1kgあたり5lの緩衝液の割合で、攪拌しながら1時間行われる。その後、磨碎した材料1kgあたり5lの水の割合で、軟水を用いて2回連続して洗浄を行い、その後引き続いて4000rpmで連続遠心分離(Rous s e l e t 遠心分離)を行なってリン酸緩衝液を除去する。その後、0.25M

の酢酸溶液を用いて、10lの溶液に対して磨碎した材料1kgの割合で、磨碎した材料を酸性化する。その後、ゲルを4000rpmで5分間遠心分離する。使用されるゲルは、コラーゲン濃度が0.5%~2%の間にある得られた上清からなる。

【0048】

B. 上記で得られたコラーゲンゲルからの多孔性マトリックスの調製

このゲルを凍結乾燥皿に20g/cm²の割合で注ぐ。その後、ゲルは、-30°Cで凍結し、そして+32°Cで加熱した後、凍結乾燥される。総凍結乾燥時間は400マイクロバルの圧力で16時間である。その後、得られたマトリックスを加熱脱水(TDH)によって架橋する。加熱脱水は、400マイクロバルの真空中で16時間にわたって110°Cのオープンで加熱することからなる。

【0049】

実施例2

欧洲特許第466829号(1996年7月24日)に記載される技術によってジフェニルホスホリルアジド(DPPA)で架橋された多孔性マトリックスの調製

実施例1のコラーゲンマトリックスを、100mlのジメチルホルムアミド(DMF)に5μl~250μlのDPPA/gコラーゲンを含有する溶液中で24時間インキュベーションする。その後、コラーゲンを100mlのDMFで洗浄して、DPPAを除く。次いで、DMFを、pH8.9のホウ酸塩緩衝液溶液(0.04M四ホウ酸ナトリウム、0.04Mホウ酸)の100mlで洗浄することによって除去する。

最後に、コラーゲンを同じホウ酸緩衝液中で一晩インキュベーションし、その後、6時間にわたって軟水で連続的に洗浄することによってホウ酸緩衝液を除去する。

【0050】

実施例3

カルボジイミド及びN-ヒドロキシスクシンイミドで架橋された多孔性マトリックスの調製

実施例1の水生動物コラーゲンマトリックスを、EDC（エチルジメチルアミノプロピルカルボジイミド）をコラーゲン1gあたり0.23g～0.69gの濃度で、そしてNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）を0.42g/gコラーゲンの濃度で架橋する。

軟水で洗浄した後、コラーゲンを再び凍結乾燥する。

【0051】

実施例4

グルタルアルデヒドで架橋された多孔性マトリックスの調製

実施例1の水生動物コラーゲンの多孔性マトリックスを、0.6%～1%のGTAを含有する溶液中で、20℃で24時間～96時間にわたって架橋する。

軟水で洗浄した後、コラーゲンを再び凍結乾燥する。

【0052】

実施例5

欧州特許第296078号（1991年5月29日）に記載されるような、キトサン及びグリコサミノグリカンと組み合わせて実施例1の水生動物天然コラーゲンを用いて調製される多孔性マトリックス

356mlの水に2.5gのキトサンを含む溶液及び1.9mlの酢酸、次いで400mlの軟水に1gのコンドロイチン4-硫酸を含む溶液を600gの1.5%コラーゲンゲルに加える。続いて、約4.0のpHを有するこの混合物を攪拌して、凍結乾燥する。得られた海綿状体をTDHによって架橋する。

【0053】

実施例6

コラーゲンフィルムで被覆された実施例1に記載される多孔性マトリックス

A. フィルムの調製

固体含有量が0.3%～0.8%であるコラーゲンゲルを30℃のオーブンで乾燥するか、又は0.5gゲル/cm²皿の割合でフード下で乾燥する。10%～40%のグリセロールをコラーゲンゲルに添加することができる。

これらの条件のもとで乾燥したコラーゲンを透明なフィルムにする。

【0054】

B. フィルムと上記に記載される多孔性マトリックスとの結合

固体含有量が0.5%~2%である水生動物の天然コラーゲンゲルを凍結乾燥皿に0.5 g/cm²の割合で置き、その後、コラーゲンフィルムをこのゲルの上に置き、全体を凍結乾燥する。

得られた凍結乾燥物をTDHによって架橋する。

【0055】

実施例7

酸可溶性コラーゲンゲルを用いて調製され、コラーゲンフィルムで被覆された多孔性マトリックス

方法は、実施例6に示される方法であるが、唯一の違いは、フィルムに注がれたゲルの性質にある。このゲルは、当業者に十分に公知の技術によって調製される酸可溶性コラーゲンからなる。

【0056】

実施例8

アテロコラーゲンゲルを用いて調製され、コラーゲンフィルムで被覆された多孔性マトリックス

方法は、実施例6に示される方法であるが、唯一の違いは、フィルムに注がれたゲルの性質にある。このゲルは、当業者に十分に知られている技術によって調製されるアテロコラーゲン（すなわち、テロペプチド非含有コラーゲン）からなる。

【0057】

実施例9

キトサン及びグリコサミノグリカンと組み合わせたコラーゲンからなり、コラーゲンフィルムで被覆された多孔性マトリックス

方法は、この場合には、コラーゲンフィルムに注がれたゲルが、コラーゲン、キトサン及びグリコサミノグリカンからなることを除いて、実施例6に示される方法である。このゲルの調製は実施例5に記載される。

【0058】

実施例10

上記の多孔性マトリックスはすべて、コラーゲンフィルムで被覆されており、実施例2、3及び4に記載される技術によって架橋することができる。

【0059】

実施例1.1

圧縮されたコラーゲン海綿状体で被覆された、実施例1に記載したコラーゲンのみの多孔性マトリックス

A. 圧縮された海綿状体の調製

固体含有量が0.3%~1.5%である、実施例1のように調製されたコラーゲンゲルを凍結乾燥して、重量が0.5 g/cm²~2 g/cm²である海綿状体を得る。

この凍結乾燥物を20°C~60°Cの温度及び50 bar~200 bar (50~200×10⁵ Pa) の圧力で5秒間~60秒間圧縮する。

【0060】

B. 圧縮された海綿状体と多孔性マトリックスとの結合

実施例1に記載されるコラーゲンゲルを凍結乾燥皿に0.5 g/cm²の割合で置く。次いで、圧縮された海綿状体をこのゲルの上に置き、全体を凍結乾燥して、圧縮されたコラーゲン海綿状体で被覆された多孔性コラーゲン海綿状体を得る。全体を、実施例1に記載されるようにTDHによって架橋する。

【0061】

実施例1.2

実施例5に記載するように、コラーゲン、キトサン及びグリコサミノグリカンからなり、圧縮された海綿状体で被覆された多孔性マトリックス

実施例5のプロセスによって調製された、コラーゲン、キトサン及びグリコサミノグリカンからなるゲルを凍結乾燥皿に0.5 g/cm²の割合で置き、次いで、圧縮された海綿状体をこのゲルの上に置き、全体を凍結乾燥する。その後、凍結乾燥物を、実施例1に記載されるようにTDHによって架橋する。

【0062】

実施例1.3

上記の多孔性マトリックスはすべて、圧縮されたコラーゲン海綿状体で被覆され

ており、実施例2、3及び4に記載される技術によって架橋することができる。

【0063】

実施例14～16：ウシ及び水生動物のコラーゲンマトリックスの細胞代謝を比較するための試験

【0064】

実施例14：纖維芽細胞の細胞生存性に対する試験

I-真皮等価物の調製

この比較試験のために、実施例2に従ってDPPA架橋された水生動物多孔性マトリックスが最初に調製される。

【0065】

比較として、ウシマトリックスと呼ばれる比較用の多孔性マトリックスが、これもまたDPPAで架橋されるが、実施例2の条件と同じ条件のもとでウシ起源のコラーゲンを用いて調製される。

【0066】

若年ドナープールから採取され、7代目の継代で使用される正常なヒト纖維芽細胞を、増殖及びタンパク質合成の研究の場合には250,000細胞/cm²の割合で、そして組織化学的研究を目的とする水生動物及びウシのマトリックスの場合には300,000細胞/cm²の割合で、水生動物及びウシのマトリックスのそれぞれに播種する。

【0067】

これらの水生動物マトリックス及びウシマトリックスは、10%のウシ胎児血清、100IU/mlのペニシリン、25μg/mlのゲンタマイシン、1μg/mlのアンホテリシンB及び50μg/mlのビタミンCが補充された、50/50(v/v)の比のDMEM/HAM F12からなる培地で培養される。

この培養は1ヶ月間行われ、培養培地が1週間に3回交換される。

【0068】

II-行われた分析

1) MTTとの反応による細胞生存性の測定

1重量%のMTT(すなわち、3-(4-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,

5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド) を培養培地に加える。
 インキュベーションを37°Cで2.5時間行なう。
 このインキュベーション期間の後、変換生成物(ホルマザンブルー)をDMSOに可溶化して、その光学密度を550nmにおいて読み取る。
 得られた光学密度は、明黄色のテトラゾリウム塩、MTTをホルマザンの青色結晶に変換することができるコハク酸デヒドロゲナーゼの活性に比例している。
 細胞生存性が、培養の1日後、5日後、7日後及び22日後並びに1ヶ月後に測定された。
 平均値を求めるために、6つのサンプルがそれぞれのマトリックスについて調製された。

【0069】

【表1】

結果

日数	水生動物マトリックス	平均標準偏差	ウシマトリックス	平均標準偏差
1	487	24	403	40
5	604	19	393	59
7	520	56	398	64
22	608	30	680	40

【0070】

これらの結果はまた、添付の図1の曲線のために使用される。
 ひし形の点の曲線が水生動物マトリックスで得られた曲線であり、四角の点の曲線がウシマトリックスで得られた曲線であることが認められる。

【0071】

これらの結果は、全く驚くべきことに、水生動物マトリックスが、正常なヒト織維芽細胞の生存だけでなく、これらの正常なヒト織維芽細胞の増殖をも可能にしている担体を構成し、その一方で同時に、最初の3週間の間、はるかにより良好な培養担体を構成していることを示している。

従って、驚くべきことに、水生動物コラーゲンは、組織工学用担体を製造するために、特に、生きた細胞、特に、そして好ましくはヒトの生きた細胞を含有する

生体材料を形成させるためのインビトロでの適用に、そしてとりわけインビオでの適用さえも特に好適であると、これらの試験から結論することができる。

【0072】

2) タンパク質合成の測定

ウシ胎児血清を含まない培養培地に3日間わたって分泌されたタンパク質の合成を、真皮等価物の調製において上記に報告された条件のもとで1ヶ月の培養を行った後で得られるような真皮等価物の成熟化の1ヶ月後に評価した。

分析をPierceのミクロBCA法により行なう。

細胞密度が、上記の条件下でのMTT試験で同時に評価された。

相対タンパク質含有量は、光学密度又はODとして表される細胞密度の1ユニットあたりのタンパク質含有量に対応するので、問題としている細胞濃度は等しい。得られた結果を下記の表IIに示す。

【0073】

【表2】

タンパク質合成の結果

担体のコラーゲン	水生動物マトリックス		ウシマトリックス	
	平均	*	平均	*
細胞密度 (OD)	2.12	0.09	1.91	0.13
タンパク質 (μg/ml)	494	48	499	32
相対タンパク質含有量	233	18	262	23

*: 平均標準偏差

【0074】

表Iのように、平均値は6つのサンプルに基づく。

【0075】

3) 組織化学

水生動物及びウシのコラーゲンマトリックスの21日間の培養の後に得られた真皮等価物を2%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、その後、四酸化オスミウム溶液で後固定し、脱水して、Eponに封入し、切片化して、CMEAGB (Lyons, フランス)において透過電子顕微鏡検査 (Jeol 1200) によって観察した。

【0076】

結論

これらの結果は、マトリックスが水生動物又はウシであるかにかかわらず、三次元マトリックスの非常に良好なコロニー形成を示している。3週間の培養後、細胞密度は両タイプのマトリックスにおいて等しい。しかし、水生動物マトリックスは、第1週の培養における増殖研究によって示されるように、実験の初期におけるより良好な細胞接着、従って、短い培養期間のより良好なコロニー形成を可能にしているようである。

【0077】

タンパク質合成に関する限り、纖維芽細胞の合成能力（相対タンパク質含有量）もまた1ヶ月の培養後において等しい。

【0078】

これらの結果は、開発された水生動物コラーゲンマトリックスが、良好な性質を有する真皮等価物の調製を可能にしたことを示しており、そしてこれらのマトリックスを用いて得られる結果は、ウシのコラーゲンマトリックスを用いて得られた結果と匹敵し得る。

【0079】

透過電子顕微鏡検査では、纖維芽細胞をウシ起源及び水生動物起源のマトリックスにおいて認めることができる。両タイプのマトリックスにおいて、多量の新しく合成された細胞外マトリックスの存在が認められる。新しく合成された細胞外マトリックスは、最初の海綿状体の三次元マトリックスを形成するコラーゲンクラスターと比較して、堆積したコラーゲン纖維の周期的な細い縞によって区別することができる。

【0080】

実施例15細胞生存性に対する水生動物コラーゲンマトリックスの異なるタイプの架橋の影響

下記の試験が、細胞生存性に対する水生動物コラーゲンマトリックスの異なるタイプの架橋の影響を調べるために行われる。

【0081】

1) 真皮等価物の調製

a) 使用される担体又はマトリックス

様々なコラーゲン担体又はマトリックスが、下記のように、多孔性の層又はマトリックスを製造するためのコラーゲンゲルにおいて異なる割合のコラーゲンを使用して、そして必要な場合には異なる架橋剤を使用して調製される。

【0082】

1) 試験1

この試験のために、多孔性海綿状体の形をとる多孔性マトリックスが、1.3重量%の水生動物コラーゲンから調製された水生動物コラーゲンゲルから製造される。これは、-80°Cで凍結され、実施例2による標準的な凍結乾燥に供され、その後、乾燥状態の海綿状体1gあたり250μlの割合でDPPAを用いて架橋される。

【0083】

2) 試験2

この試験に、水生動物性海綿状体の形をとる多孔性マトリックスが、0.7重量%の水生動物コラーゲンを含む水生動物コラーゲンゲルから調製される。これは、試験1のように、-80°Cで凍結され、その後、標準的な凍結乾燥に供され、乾燥海綿状体1gあたり250μlの割合でDPPAを用いて架橋される。

【0084】

3) 試験3

この試験について、手順は、架橋が、乾燥海綿状体1gあたり0.46gの割合で実施例2に従ってEDCを用いて行われることを除いて、試験1の通りである。

【0085】

4) 試験4

1. 1重量%の水生動物コラーゲンを含む水生動物コラーゲンゲルから得られる水生動物コラーゲンの海綿状体を含む多孔性担体が調製される。これは、試験2のように、-80°Cで凍結され、その後、標準的な凍結乾燥に供され、乾燥海綿

状体1 gあたり250 μlの割合でDPPAを用いて架橋されるが、その違いは、水生動物コラーゲンの割合が1.1重量%であることがある。

【0086】

これらの試験のすべてにおいて、水生動物コラーゲンは、実施例2のようにシタビラメの腹側皮膚に由来する。

【0087】

b) これらのマトリックスにおける纖維芽細胞の培養

正常なヒト纖維芽細胞が実施例14のように使用されるが、纖維芽細胞は8代目の継代から採取される。

播種が275,000細胞/cm²の割合で行われる。

培養培地は、10重量%のウシ胎児血清、100IU/mlのペニシリン、25 μg/mlのゲンタマイシン、1 μg/mlのアンホテリシンB及び50 μg/mlのビタミンCが補充された50/50(v/v)のDMEM/HAM F1 2からなる。

培養は1ヶ月間行われ、培地が1週間に3回交換される。

4つのマトリックスが、試験のそれぞれのタイプについて平均値が得られ、平均標準偏差が評価されるように、それぞれの試験について使用される。

【0088】

I I) 行われた分析

アラマーブルー(レドックスマーカー)との反応による細胞生存性の測定

培養培地から採取されるサンプルについて細胞生存性を測定することが所望されるときには、アラマーブルーが、使用された培養培地の2重量%の割合で添加される。

37°Cで2時間20分にわたってインキュベーションした後、蛍光を、530nmでの励起光及び590nmでの放出光に基づいて読み取る。

得られる蛍光強度は細胞の代謝活性に比例している。

細胞生存性が、培養の1日後、4日後、6日後、11日後及び17日後に10個のサンプルについて測定される。

結果は下記の表I I Iに表される。

結果は、時間の関数として蛍光の国際単位（IU）で示されている。

【0089】

【表3】

細胞生存性(蛍光(IU))

時間 (日数)	試験 1		試験 2		試験 3		試験 4	
	平均	SD*	平均	SD*	平均	SD*	平均	SD*
1	21,734	1184	30,535	1888	25,528	6820	28,461	3805
4	31,611	920	35,623	3544	36,404	3570	45,126	2930
6	43,144	2500	35,244	2095	37,819	4170	41,254	3396
11	42,808	1481	38,532	2537	42,442	3112	44,508	2329
17	45,484	2426	45,094	1470	43,963	8285	43,939	4521
順位	1		2		3		4	

*: 標準偏差

【0090】

表3の結果もまた、添付の図2のために使用される。

結果は、真皮等価物における繊維芽細胞の増殖曲線を示している。

黒ひし形の点を伴う曲線は試験1に対応し、黒四角の点を伴う曲線は試験2に対応し、三角の点を伴う曲線は試験3に対応し、十字の点を伴う曲線は試験4に対応する。

時間が横軸に日数で表され、蛍光が、15,000から始まり、10,000単位で55,000まで増大するスケールを用いてIUで表されている。

結果から、下記の結論を引き出すことができる。

【0091】

結論

結果は、調製された種々のマトリックスが、17日の培養後において繊維芽細胞の良好な増殖を可能にし得ることを示している。水生動物コラーゲンマトリックスの調製に関係なく、繊維芽細胞は、それらの三次元担体に良好に接着し、非常に迅速に分裂して、マトリックスにおいてコロニー形成する。

【0092】

増殖プロフィールはマトリックスのタイプ毎に非常にわずかに変化しているが、繊維芽細胞の密度は、調製方法にかかわらず、17日の培養後において匹敵し得

る。

【0093】

DPPA又はEDCのいずれかを用いて行われた種々のタイプの架橋は細胞の再生に影響を及ぼしていないようである。実際には3週間の培養後において、マトリックスの安定性は優れており、ほとんど消化されず、そしてほとんど収縮していない。

【0094】

実施例16

新しく合成されたヒトコラーゲンの同定及びアッセイについて水生動物コラーゲンの利点を明らかにする試験

この試験は、組織化学が免疫標識とともに行われることを除いて、実施例14の試験に類似している。

試験は下記のように行われる。

【0095】

1) 真皮等価物の調製

これらは実施例14の真皮等価物であり、培養が実施例14の条件のもとで行われる。

従って、この培養は、実施例14に示されるように、正常なヒト繊維芽細胞が300,000細胞/cm²の割合で播種され、培地を1週間に3回交換しながら3週間にわたって行われる。

【0096】

2) 組織化学

a) 従来的な組織化学

固定が、4重量%の濃度のパラホルムアルデヒドを用いて行われ、その後、材料は脱水され、パラフィンに封入される。

この後、7μmの切片が調製され、そしてパラフィンの除去及び再水和の後にマロリー・ハイデンハイン染色が行われる。

b) 免疫標識

固定が、4重量%のパラホルムアルデヒドを用いて再び行われ、材料はTiss

use Tek OCTコンパウンド、すなわち、Miles (Elkhart, Indiana、米国) により供給される封入液に封入され、7 μm の切片が低温で調製される。

免疫標識は下記を用いて行われる：

- i. 一次のウサギ抗ヒトI型コラーゲン抗体（希釀、1/40）及び
- ii. 二次のFITC（フルオレセインイソチオシアナート）結合抗ウサギ抗体（希釀、1/160）。

DAPI（4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドールジラクテート）が対比染色として使用される。

【0097】

3) 結果

水生動物マトリックス及びウシマトリックスからなる担体は、纖維芽細胞が接着する多少なりとも詰まっていない細孔を形成していることが見出される。

より大きい割合の纖維芽細胞が表面に認められ、再生皮膚を製造するために真皮等価体を覆う好適な被覆を形成している。纖維芽細胞の分布は水生動物の海綿状体及びウシの海綿状体において均質である。

免疫標識では、ウシコラーゲンから形成されたマトリックスが抗ヒトI型コラーゲン抗体によって標識されることが見出される（交差）。

一方、水生動物起源のマトリックスは抗ヒトコラーゲン抗体によって非常に弱く標識されるだけである。

従って、水生動物コラーゲンから構成される海綿状体は、新しく合成された細胞外マトリックスの同定には好都合である。

これらの結果は、下記の表IV又はHartmannの表に示される免疫標識後の光学密度測定値によって決定される、種々の抗体に対する種々の抗原の反応に関するHartmann教授の研究によって説明される。

【0098】

【表4】

ヒト、ウシおよび魚類のコラーゲンとの交差反応 (Elisa)

抗原 抗体	シタビラメ I型 コラーゲン	ヒト I型 コラーゲン	ウシ I型 コラーゲン
20111 (225)			
1/25	190	>	815
1/50	210	>	548
1/100	73	1233	234
1/200	43	605	136
1/400	56	326	165
50121 (03)			
1/25	180	1550	>
1/50	130	1094	>
1/100	158	536	>
1/200	96	305	967
1/400	109	215	728
50171 (01)			
1/25	1880	64	73
1/50	1043	193	32
1/100	571	51	33
1/200	523	51	87

(>: 2000 よりも大きい光学密度)

【0099】

結果は、OD × 10³ (λ = 450 nmにおける光学密度) で表されている。

記号 : 20111 (225) : 抗ヒト I型コラーゲン

50121 (03) : 抗ウシ I型コラーゲン

50171 (01) : 抗魚類 (シタビラメ) I型コラーゲン

【0100】

この表の結果は、免疫標識における抗体（抗ヒト I型コラーゲン、抗ウシ I型コラーゲン、抗シタビラメ I型コラーゲン）にかかわらず、ヒトコラーゲンとシタビラメコラーゲンとの差が、ヒトコラーゲンとウシコラーゲンとの差よりも大きいことを示している。従って、魚類コラーゲンマトリックスでは、ヒト繊維芽細胞によって合成されたコラーゲンをはるかに容易に同定することができる。このことは、魚類コラーゲンマトリックス中で合成されたコラーゲンを抗ヒト I型コラーゲン抗体で免疫標識することによって得られた上記の結果を確かなものにしており、従って、本発明の特に予想外で、好適な結果を構成している。

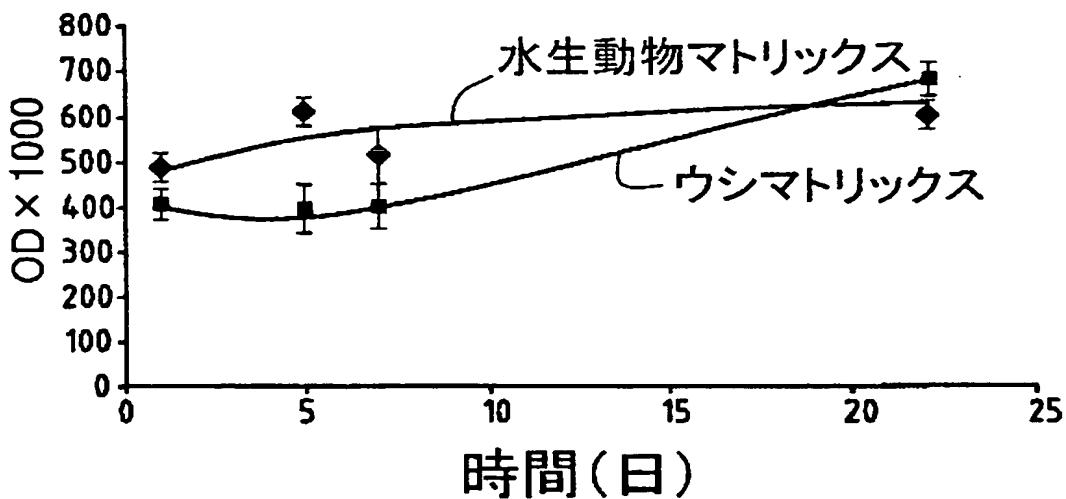
【図面の簡単な説明】

【図1】 真皮等価物における正常なヒト繊維芽細胞の増殖を示す。日数で表される時間が横軸にプロットされ、そして光学密度×1000が縦軸にプロットされ、100単位ごとに目盛りを付してある。ひし形の点を伴う曲線は、使用された担体が水生動物コラーゲン（この場合には魚類コラーゲン）の多孔性マトリックスであるときに得られた曲線である。四角の点を伴う曲線は、ウシコラーゲンで得られた曲線である。

【図2】 真皮等価物における正常なヒト繊維芽細胞の増殖に対する類似の曲線を示す。日数で表される時間が横軸にプロットされ、国際単位（IU）で表される蛍光が縦軸にプロットされ、15,000から始まり、10,000単位ごとに目盛りを付してある。黒ひし形の点を伴う曲線は、試験1で得られた蛍光を表し、四角の点を伴う曲線は、試験2で得られた曲線を表し、白三角の点を伴う曲線は、試験3で得られた曲線を表し、そして最後に、十字の点を伴う曲線は、試験4で得られた曲線を表す。

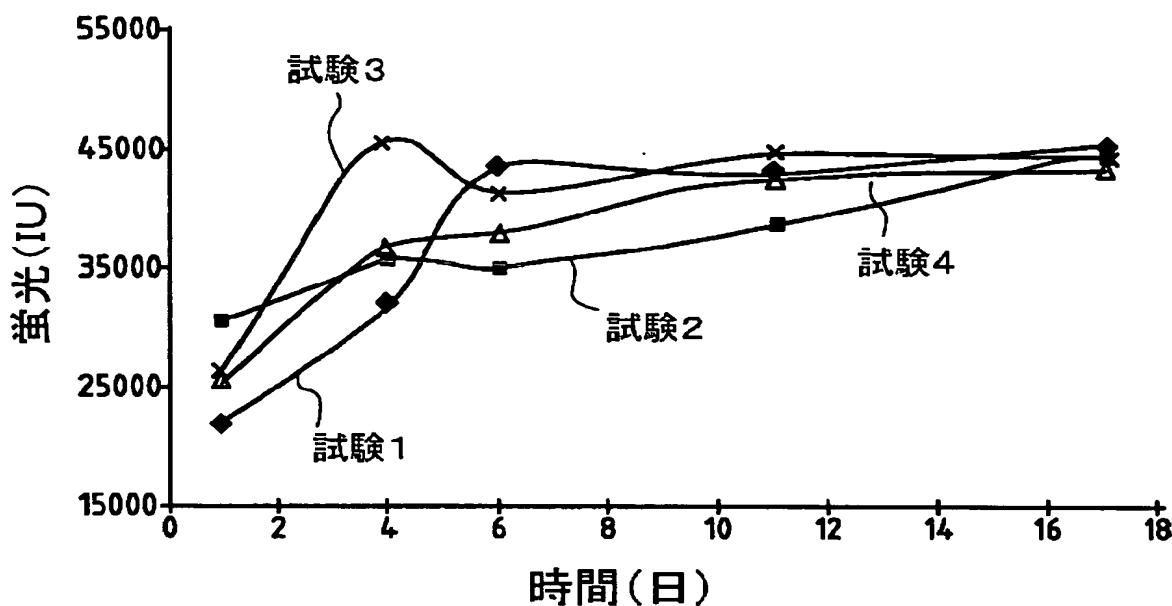
【図1】

真皮等価物における増殖



【図2】

真皮等価物における繊維芽細胞の増殖



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/FR 01/01629
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/46 C12N5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, SCISEARCH, EMBASE, BIOTECHNOLOGY ABS, CHERM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YEH M.I ET AL: "A novel native matrix for tissue engineering. Analysis of cell-matrix interaction." FASEB JOURNAL, vol. 14, no. 4, 15 March 2000 (2000-03-15), page A444 XP000982329 Annual Meeting of Professional Research Scientists: Experimental Biology 2000; San Diego, California, USA; April 15-18, 2000 ISSN: 0892-6638 abstract</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	1,2,14, 15
Y	—	3-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"U" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"A" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 August 2001	23/08/2001	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-3018	Authorized officer ALCONADA RODRIG., A	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01629

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199520 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-151478 XP002161598 & JP 07 075566 A (MARINO FORUM 21 SH), 20 March 1995 (1995-03-20) abstract —	1,2,14, 15
X	EP 0 753 313 A (HOKKAIDO GOVERNMENT ;DAIDO HOXAN INC (JP)) 15 January 1997 (1997-01-15)	1,2,14, 15
Y	page 4, line 45 —page 9, line 15 —	3-13
X	WO 97 20569 A (USALA ANTON LEWIS ;ENCILLE INC (US)) 12 June 1997 (1997-06-12)	1,3,4, 14,15
Y	* page 30, ligne 1-9 * * page 34, ligne 1-4 *	5-13
X	US 5 420 248 A (DEVICTOR PIERRE ET AL) 30 May 1995 (1995-05-30) column 2, line 20-30	1,2,14, 15
Y	column 1, line 28-41 —	3-12
Y	WO 90 12055 A (BIOETICA SA) 18 October 1990 (1990-10-18) example 2 —	3,4,6
Y	US 5 166 187 A (COLLOMBEL CHRISTIAN ET AL) 24 November 1992 (1992-11-24) examples 1,5 —	7,9-11
Y	WANG MING-CHE ET AL: "Collagen fibres with improved strength for the repair of soft tissue injuries." BIOMATERIALS, vol. 15, no. 7, 1994, pages 507-512, XP000982411 ISSN: 0142-9612 the whole document —	4,5
Y	FR 2 724 563 A (COLETICA) 22 March 1996 (1996-03-22) page 7, line 4-23; claim 8 —	8,12,13
		—/—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01629

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GIRAUD-GUILLE M -M M -M ET AL: "Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states" BIOMATERIALS, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, vol. 21, no. 9, May 2000 (2000-05), pages 899-906, XP004202455 ISSN: 0142-9612 the whole document</p> <p>_____</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/01629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 7075566 A	20-03-1995	NONE	
EP 0753313 A	15-01-1997	JP 2731833 B JP 9010246 A CA 2179881 A NO 962679 A US 5698228 A	25-03-1998 14-01-1997 27-12-1996 27-12-1996 16-12-1997
WO 9720569 A	12-06-1997	US 5830492 A AU 714465 B AU 1119297 A CA 2239498 A EP 0865288 A JP 2000507202 T ZA 9610297 A	03-11-1998 06-01-2000 27-06-1997 12-06-1997 23-09-1998 13-06-2000 18-06-1997
US 5420248 A	30-05-1995	FR 2678624 A AT 157386 T CA 2112805 A DE 69221872 D EP 0592586 A ES 2108759 T WO 9301241 A JP 2722014 B JP 6511269 T	08-01-1993 15-09-1997 21-01-1993 02-10-1997 20-04-1994 01-01-1998 21-01-1993 04-03-1998 15-12-1994
WO 9012055 A	18-10-1990	FR 2645870 A AT 140709 T AU 5531690 A BR 9007287 A CA 2051426 A DE 69027925 D DE 69027925 T EP 0466829 A ES 2092507 T HU 208840 B JP 7103239 B JP 4504586 T KR 160309 B MC 2187 A NO 177502 B RU 2061000 C US 5264551 A	19-10-1990 15-08-1996 05-11-1990 03-03-1992 13-10-1990 29-08-1996 19-12-1996 22-01-1992 01-12-1996 28-01-1994 08-11-1995 13-08-1992 15-01-1999 16-09-1992 19-06-1995 27-05-1996 23-11-1993
US 5166187 A	24-11-1992	FR 2616318 A AT 63825 T DE 3863011 D EP 0296078 A WO 8810123 A GR 3002084 T JP 2500723 T	16-12-1988 15-06-1991 04-07-1991 21-12-1988 29-12-1988 30-12-1992 15-03-1990
FR 2724563 A	22-03-1996	FR 2724562 A AU 3475395 A EP 1019112 A WO 9608277 A	22-03-1996 29-03-1996 19-07-2000 21-03-1996

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7 識別記号 F I テーマコード (参考)
C 12 N 11/02 A 61 K 37/12

(72) 発明者 ナビル アブドュル マラク
フランス国 エフ-69300 カリュイール,
リュ フレデリック ミストラル 27

(72) 発明者 アラン ウック
フランス国 エフ-69110 セント フオ
ア レ リヨン, シュマン デ サント
ン 26

F ターム(参考) 4B033 NA16 NB49 NB58 NB68 NC04
ND12 NF06 NG05
4C081 AA12 AB19 CD12 DA02
4C084 AA02 BA05 BA26 MA63 ZA89
4C087 AA01 AA02 BB29 CA16 MA63
ZA89